

FLUORESCENCE READER

Patent number: WO02097408
Publication date: 2002-12-05
Inventor: KONDO SEIJI (JP); OHASHI YOKO (JP); DOSAKA SHINICHI (JP); KARAKI SACHIKO (JP)
Applicant: KONDO SEIJI (JP); OHASHI YOKO (JP); DOSAKA SHINICHI (JP); KARAKI SACHIKO (JP); OLYMPUS OPTICAL CO (JP)
Classification:
- **International:** G01N21/64
- **European:** G01N21/64P; G01N21/64
Application number: WO2002JP05280 20020530
Priority number(s): JP20010163394 20010530

Also published as:

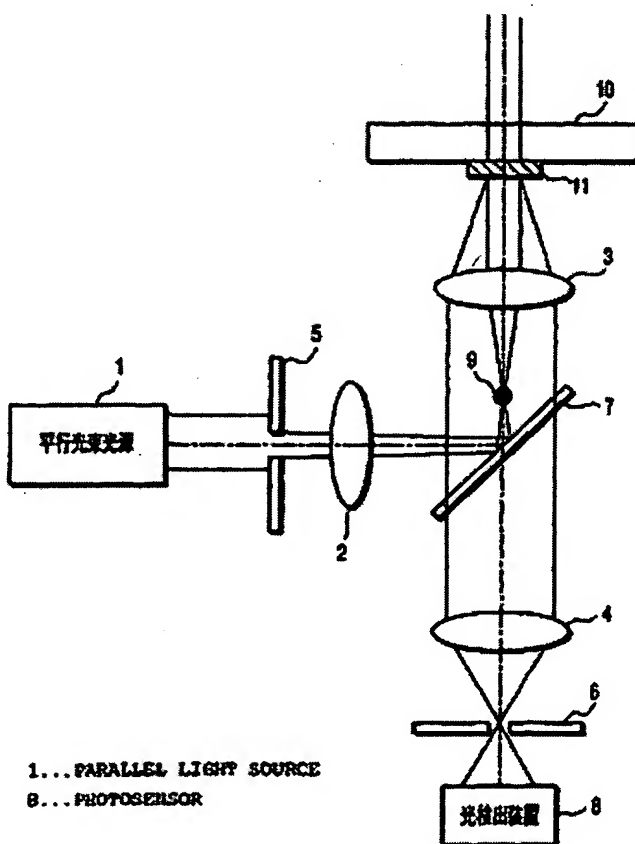
EP1406082 (A1)
US2004130715 (A1)
JP2002357549 (A)

Cited documents:

JP2002014044
JP8043739
JP5072481

Abstract of WO02097408

A fluorescence reader for detecting fluorescence from a specimen present on a carrier or in a solution; comprising a light source emitting parallel light; a projection lens for focusing the light from the light source; an objective for directing the light focused at the back focal point toward the specimen; a focusing lens for focusing the fluorescence emitted from the specimen and passed through the objective; a light-receiving pinhole made at the focal point of the focusing lens; and sensing means for detecting the fluorescence passed through the light-receiving pinhole;



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 12 月 5 日 (05.12.2002)

PCT

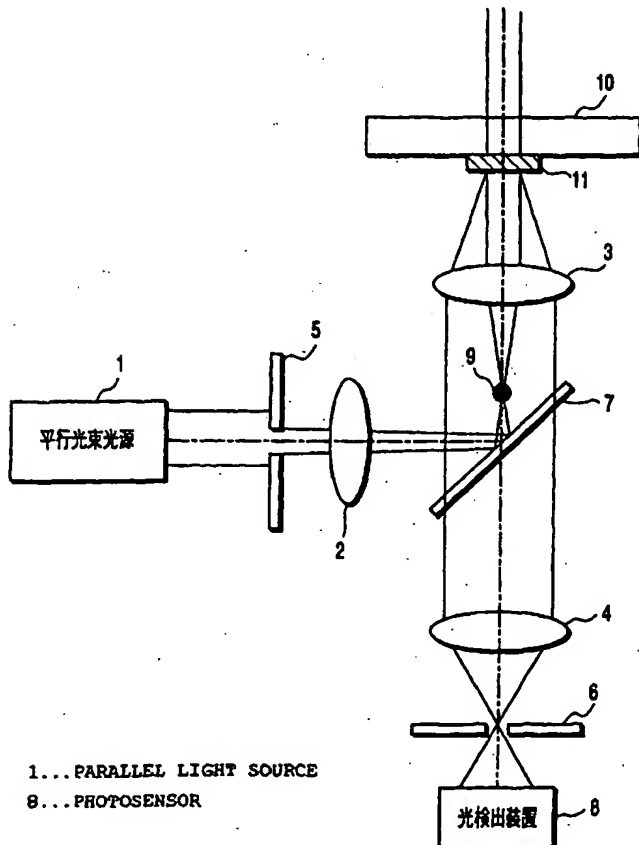
(10) 国際公開番号
WO 02/097408 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 21/64 (72) 発明者: および
(21) 国際出願番号: PCT/JP02/05280 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 土坂 新一
(22) 国際出願日: 2002 年 5 月 30 日 (30.05.2002) (DOSAKA, Shinichi) [JP/JP]; 〒199-0205 神奈川県 津
(25) 国際出願の言語: 日本語 久井郡藤野町 日連 8 1 9-3 Kanagawa (JP). 近藤 聖
(26) 国際公開の言語: 日本語 二 (KONDO, Seiji) [JP/JP]; 〒192-0045 東京都 八王子
(30) 優先権データ: 特願2001-163394 2001 年 5 月 30 日 (30.05.2001): JP 市 大和田町 5-3 3-1 0-2 0 1 Tokyo (JP). 唐木
幸子 (KARAKI, Sachiko) [JP/JP]; 〒191-0003 東京都
日野市 日野台 1-1-1 日野台ハイツ 4 1 0 Tokyo
(JP). 大橋 陽子 (OHASHI, Yoko) [JP/JP]; 〒182-0012 東
京都 調布市 深大寺東町 7-1 0-3 ノガヤ東マン
ション 2 0 5 号 Tokyo (JP).
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): オリン
パス光学工業株式会社 (OLYMPUS OPTICAL CO.,
LTD.) [JP/JP]; 〒151-0072 東京都 渋谷区 幡ヶ谷 2 丁
目 4 3 番 2 号 Tokyo (JP). (74) 代理人: 鈴江 武彦, 外 (SUZUYE, Takehiko et al.); 〒
100-0013 東京都 千代田区 霞が関 3 丁目 7 番 2 号 鈴
江特許総合法律事務所内 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: FLUORESCENCE READER

(54) 発明の名称: 蛍光読み取り装置



(57) Abstract: A fluorescence reader for detecting fluorescence from a specimen present on a carrier or in a solution, comprising a light source emitting parallel light, a projection lens for focusing the light from the light source, an objective for directing the light focused at the back focal point toward the specimen, a focusing lens for focusing the fluorescence emitted from the specimen and passed through the objective, a light-receiving pinhole made at the focal point of the focusing lens, and sensing means for detecting the fluorescence passed through the light-receiving pinhole.

[続葉有]



(81) 指定国 (国内): CN, KR, SG, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (DE, FI, FR, GB, SE).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約:

本発明の蛍光読み取り装置は、担体上もしくは溶液中に存在する試料からの蛍光を検出する蛍光読み取り装置であり、平行光を照射する光源と、この光源からの光を集光させる投光レンズと、後側焦点位置に集光された前記光を、前記試料へ照射する対物レンズと、前記試料から発し前記対物レンズを通った蛍光を結像する結像レンズと、この結像レンズの結像位置に設けられた受光ピンホールと、この受光ピンホールを通った前記蛍光を検出する検出手段と、から構成されている。

明 細 書

蛍光読み取り装置

技術分野

本発明は、担体上もしくは溶液中に存在する試料からの蛍光を検出する蛍光読み取り装置に関するものである。

背景技術

この種の装置には、特に検出目的である核酸の特異的な配列の一部に、相補的な配列(以下、プローブ)をガラスやシリコン、プラスチックなどの担体上に固相した、いわゆるDNAチップ、DNAマイクロアレイの蛍光を測定する装置がある。この装置では、各プローブに蛍光を標識することにより測定が行われる。しかし、ここで検出すべき蛍光量は、他の細胞や組織を検出対象とした蛍光量に比較して非常に微量であることが知られている。

そこで、蛍光量の高感度な検出を行う必要がある。そのための蛍光読み取り装置の原理は、

(1) 共焦点/光電子増倍管/スキャンニング方式

(2) 冷却CCD方式

に大きく分けられる。これらは、それぞれ以下のような特徴がある。

(1) この方式の蛍光読み取り装置は、共焦点レーザー方式によりスキャンニングを行い、主にガラス担体上の核酸の結合反応を検出する用途に用いられる。共焦点方式にて外乱光によるノイズの除去を行い、高測定性能を実現しているが、焦点深度が非常に浅い。一般的な共焦点レーザー方式の焦点

深度は対物レンズのNAに依存しており、次式によって求められる。

$$\text{焦点深度} = (0.6 \times \text{波長}) / (\text{NA})^2$$

例えば、波長632nmのレーザーを用いてNA0.3のレンズを使用した場合は、焦点深度は上式から約4μmとなる。このように非常に狭い深度を有する光学系においては、焦点が合えばノイズのない明瞭な蛍光測光が得られる。しかし、焦点がずれると正確な蛍光量を測定できず、ガラス内部にピン트가合うとガラスの自家蛍光をひろい、バックグラウンドが明るくなる。このため、チップ、アレイ側の歪みやたわみなどの影響を受けやすく、チップ、アレイ前面について均一な蛍光面像が得られにくいという懸念がある。

また、この種の最新型の装置では、スキヤニングに同調するオートフォーカシング機能を取り入れ、均一な蛍光面像を得る改良を行っているが、装置の大型化、高価格化という難点がある。

(2) この方式の蛍光読み取り装置は、光源にハロゲンランプを使用し、冷却CCDを用いており、マイクロアレイシステムを使用して作成したガラス担体のマイクロアレイ上の核酸の結合反応を検出する用途に用いられている。この方式は、(1)の方式に比べて広い範囲を一度に測定できるので、読み取り時間が短い。また、露光時間を変えることにより、蛍光の強いサンプルから弱いサンプルまで幅広く対応することができる、更に、励起光用フィルターを交換することにより、使用する蛍光物質に合わせた励起光が得られるなどの特

徴を有している。

しかしながら、実際の測定においては、原理上感度が(1)の方式に劣り、高感度の解析が必要なSNPダイピンングや遺伝子発現頻度解析測定においては不十分であるという難点がある。

(1). 現在、分子生物学の分野を中心に用いられているチップやマイクロアレイは、その担体の材質が、ガラス板、シリコン板、ナイロンやニトロセルロース製の多孔質フィルターなど、さまざまである。これらの材料には、いずれも微妙な歪み、たわみ及び自家蛍光が存在する。従って、これらの材質表面上の微量蛍光を測定しようとする、上記の従来技術では、歪み等により測定面全面について均一な蛍光測光が行えない。

(2). 上記(1), (2)に示した先行技術は、それぞれ、(1)共焦点レーザー方式を用いているため、合焦時には正確な測定が可能であるが、非合焦点時には読み取り感度が低下する、(2)光電子増倍管とCCDの感度差および測光範囲の差により、CCD方式は読み取り感度が低い、という課題を有している。一般に、高感度な蛍光検出を行うためには励起光強度を高くする必要があるが、特に蛍光物質が有機材料の場合、励起光強度が高くなるに伴い、材料の劣化が著しくなる問題もある。

(3). 上記(2)に示した(1), (2)のような課題を克服するために、最新技術においては、オートフォーカス方式を取り入れたり、レーザー適用本数を増加させ、対照測定を行

なうことにより補正をする試みがなされている。しかし、これらの方策は装置を大型化し、価格も高価になる傾向がある。また、担体の形状によっては隔壁などの突起があり、オートフォーカスなどの光学系を追加することができない場合もある。

(4). 従来の装置では、焦点を数 μm 移動させただけで蛍光読み取り量が大きく変化し、ノイズ量が大幅に増減するなど、測定条件の設定が容易ではない。

本発明の目的は、測定対象の状態に関わらず均一な蛍光測光が行え、微量蛍光を高感度に検出でき、測定条件の設定を容易にするとともに、装置の小型化を図る蛍光読み取り装置を提供することにある。

発明の開示

(1) 本発明の蛍光読み取り装置は、担体上もしくは溶液中に存在する試料からの蛍光を検出する蛍光読み取り装置であり、平行光を照射する光源と、この光源からの光を集光させる投光レンズと、後側焦点位置に集光された前記光を、前記試料へ照射する対物レンズと、前記試料から発し前記対物レンズを通った蛍光を結像する結像レンズと、この結像レンズの結像位置に設けられた受光ピンホールと、この受光ピンホールを通った前記蛍光を検出する検出手段と、から構成されている。

(2) 本発明の蛍光読み取り装置は上記(1)に記載の装置であり、かつ前記投光レンズの前側焦点位置に設けられ、前記光源から照射された平行光を整形する励起ピンホールを

備えている。

(3) 本発明の蛍光読み取り装置は上記(1)または(2)に記載の装置であり、かつ前記結像レンズの結像位置に作られる像と前記受光ピンホールの大きさがほぼ等しい。

(4) 本発明の蛍光読み取り装置は上記(2)または(3)に記載の装置であり、かつ前記励起ピンホールの形状と前記受光ピンホールの径を変更可能とした。

(5) 本発明の蛍光読み取り装置は上記(1)乃至(4)のいずれかに記載の装置であり、かつ前記試料は、核酸または核酸と結合した試薬に結合した蛍光色素からなる。

(6) 本発明の蛍光読み取り装置は上記(5)に記載の装置であり、かつ前記核酸の少なくとも一部が前記担体上に1つ以上固定化されており、前記核酸と特異的に結合する試薬に蛍光色素が結合している。

(7) 本発明の蛍光読み取り装置は上記(1)乃至(6)のいずれかに記載の装置であり、かつ前記担体上に前記試料が一定間隔で配置されている標本が一定間隔毎に移動し、蛍光の測定と前記標本の移動とを繰り返して複数の前記試料を測定する。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の実施の形態に係る微量蛍光読み取り装置の光学系を示す図。

図2は、本発明の実施の形態に係る光学系の一部構成を示す図。

図3は、本発明の実施の形態に係る焦点位置に対する蛍光

量の変化を示す図。

図 4 は、本発明の実施例に係る測定結果を示す写真。

図 5 は、本発明の比較例に係る測定結果を示す写真。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態を図面を参照して説明する。

図 1 は、本発明の実施の形態に係る微量蛍光読み取り装置の光学系を示す図であり、図 2 は図 1 の一部構成を示す図である。この微量蛍光読み取り装置は、担体上もしくは溶液中に存在する試料からの蛍光を測定、定量する。

図 1 に示すように、平行光束光源 1 の光路上には、励起ピンホール 5、投光レンズ 2、及び波長選択素子（ダイクロイックミラー） 7 が備えられている。なお、励起ピンホール 5 はピンホールが設けられた板部材からなり、投光レンズ 2 の前側焦点位置に設置されている。また、波長選択素子 7 の反射光路上には、対物レンズ 3 と担体 10 に保持された試料（プローブ） 11 とが備えられている。波長選択素子 7 の透過光路上には、結像レンズ 4、受光ピンホール 6、及び光検出装置 8 が備えられている。なお、受光ピンホール 6 はピンホールが設けられた板部材からなり、結像レンズ 4 の後側焦点位置に設置されている。

平行光束光源 1 から照射された平行光は、その一部が励起ピンホール 5 のピンホールを通り、投光レンズ 2 を介して波長選択素子 7 で反射され、対物レンズ 3 の後焦点位置 9 付近に集光された後、対物レンズ 3 を介して担体 10 上（もしくは溶液中）の試料 11 にテレセントリックに照射される。試

料 1 1 から発した蛍光は、対物レンズ 3 を介して波長選択素子 7 を透過し、結像レンズ 4 によって結像され、その結像位置に設置された受光ピンホール 6 のピンホールを通り、光検出装置 8 に入射され検出される。

このように本実施の形態の構成では、投光レンズ 2 の前側焦点位置に励起ピンホール 5 を設置し、投光レンズ 2、対物レンズ 3、及び結像レンズ 4 によって作られる像の大きさと受光ピンホール 6 の大きさとをほぼ等しくしている。

本実施の形態の構成は、小穴直良光学系と呼ばれる光学系と似ているが、励起光をテレセントリック照明とした点に特徴がある。具体的には、平行光束を励起ピンホール 5 で整形し、投光レンズ 2 により対物レンズ 3 の瞳位置 9 に 1 次ピンホール像として集光させることで、試料 1 1 へ照射する励起光を一定の断面積を有した平行光束とする。このとき、図 2 に示すように、励起ピンホール 5 で生じた回折光 1 2 が、試料 1 1 面上で 2 次ピンホール像を作る。この 2 次ピンホール像により、試料 1 1 のピント位置を知ることができるため、ピント調整を正確に行なえる。

励起光によって励起され試料 1 1 から発した蛍光は、第 2 次の面光束となり、再び対物レンズ 3 を通り、結像レンズ 4 の後焦点位置で 3 次ピンホール像を作る。この 3 次ピンホール像とほぼ等しい大きさのピンホールを有する受光ピンホール 6 を設置することで、励起光が当たってる試料 1 1 の面以外から発せられた蛍光や外乱光が、光検出装置 8 に到達しないという利点がある。

ただし、担体が自家蛍光を有すると、後述するように本実施の形態における光学系の深い焦点深度により、自家蛍光を拾う問題がある。これは、光検出装置 8 の前に設置する受光ピンホール 6 のピンホールが、一般の共焦点光学系で用いられるピンホールに比べて遥かに大きくなることに起因する。一般の共焦点光学系においても、ピンホールを大きくすることで焦点深度を大きくすることは可能であるが、その場合、共焦点光学系の利点が無くなる。

図 3 は、焦点位置に対する蛍光量の変化を示す図である。本実施の形態では、蛍光は面光源（試料 11）から発しているため、一般的な光学顕微鏡と同等の焦点深度となる。したがって、従来からの問題点であった、チップやマイクロアレイの歪みやたわみの影響により蛍光データが不均一となりやすい点、および焦点合わせなどの測定条件設定が困難な点を解決することができる。しかし、担体に自家蛍光があるとバックグラウンドノイズとなり、像が全体的に明るくなる。

ところが、バックグラウンドノイズの光量は、図 3 に示すようにピントの位置に関わらずほぼ一定の値となっている。このため、あらかじめ試料 11 近傍の試料 11 の無い部分でバックグラウンドノイズの光量を測定しておき、その光量を測定された試料の蛍光量から差し引くことで、試料の正確な蛍光量の測定が可能となる。あるいは、試料に関わらず担体 10 の材質や形状がある程度一定である場合には、あらかじめバックグラウンドノイズ量を決めておいて、測定された試料の蛍光量から一律に差し引くようにしてもよい。

また本実施の形態では、励起ピンホール 5 で生じた回折光 1 2 が、試料 1 1 面上で 2 次ピンホール像を作っている。これにより、対物レンズ 3 の試料 1 1 面への焦点合わせを容易に行う事ができる。通常、励起光が試料面に平行光束として照射される場合、焦点合わせが難しいという問題が考えられるが、本実施の形態ではこの問題も解決している。さらに本実施の形態においては、オートフォーカス機構などを追加することなく、焦点合わせの効果が得られるので、小型で低価格な装置を実現できる。

さらに、試料 1 1 への励起光が一定の断面積を有した平行光束であるため、単位面積あたりの励起光強度が共焦点光学系に比べて格段に低く、色素材料の劣化を抑えることができる。これにより、許容できる同程度の劣化状態では共焦点光学系に比べて励起光強度を高くすることができ、蛍光量が増えるため高感度化も可能となる。

本実施の形態の光学系は、励起ピンホール 5 のピンホール形状、および投光レンズ 2 の焦点距離と対物レンズ 3 の焦点距離との組み合わせにより、試料 1 1 面に結像する平行光束の断面積を自由に変更できる。そのため、試料面の平行光束径と光学系の倍率を考慮した励起ピンホール 5 を設置することで、前述した効果を維持したまま測定の分解能を自由に変更することが可能となる。

また、3 次ピンホール像の大きさよりも受光ピンホール 6 のピンホールの大きさを大きくすると、試料 1 1 からの全蛍光量を光検出装置 8 で検出することが容易になる。この場合、

試料 1 1 を走査しながら測定する時の測光間隔を短くすると、光検出装置 8 の測光領域と試料 1 1 とが、(a) 全く重ならない、(b) 一部重なる、(c) 完全に重なる、の関係になる 3 つの状態が繰り返し生じる。

ここで (c) の完全に重なる状態では、測光領域内で試料 1 1 がどこに位置してようと、光検出装置 8 で測光される試料 1 1 からの蛍光量は一定である。よって、測光される蛍光量のプロファイルを解析することで、(c) の状態を容易に把握することが可能となり、(c) の状態で複数測光された蛍光量を平均化することで、S/N 比を向上させることが可能となる。

逆に、3 次ピンホール像の大きさよりも受光ピンホール 6 のピンホールの大きさを小さく、またはピンホールの形状を矩形状にすると、試料 1 1 の一部分のみからの蛍光を測光することができるので、順次走査しながら測光する事で試料 1 1 の蛍光分布を画像化し、解析することができる。上記のように励起ピンホール 5 と受光ピンホール 6 のピンホールの大きさと形状を、試料 1 1 の状態や測定目的によって変更し、使い分ける事ができる。

本実施の形態における主な測定対象は、担体 1 0 上に試料 1 1 (プローブ) として 1 つ以上固定化された核酸であり、該核酸と特異的に結合する試薬に蛍光色素が結合している。このため、試料 1 1 からの蛍光を検出することで、目的の核酸が存在するか否かを判定し、また存在した場合にはその蛍光量を測定することができる。

しかし、担体 10 上に固定化された核酸は一定の面積を有しており、通常は $3 \mu\text{m}^2 \sim 3 \text{mm}^2$ 程度であり、この試料 11 は必ずしも均一に固定化されておらず、不均一な固定がされた場合は、この同種類の試料から発する蛍光量も不均一となってしまう。よって、正確な蛍光量を測定するためには、この試料 11 全体を細かく走査して、不均一な蛍光像を更に演算して正確な蛍光量を求める必要がある。しかし、走査を精細にすると、走査に多くの時間が必要となり、効率が悪くなる。

そこで本実施の形態では、3 次ピンホール像の大きさよりも受光ピンホール 6 のピンホールの大きさをわずかに大きくし、全体の蛍光量を一度に測定することで、走査を簡略化している。また、複數に固定化された試料 11 は、お互いを区別するために、一定間隔をおいて担体 10 上に配置されて標本をなす場合がある。この場合は、励起光を試料 11 の位置のみに照射して微量蛍光の測定をした後、担体 10 とともに前記標本を前記一定間隔毎移動して次の試料 11 を測定することを繰り返すことで、複數の試料 11 に対してさらに走査を高速化することも可能である。

また、本実施の形態で利用できる平行光束光源 1 に制限はないが、よく用いられる光源としてレーザー光源がある。光検出装置 8 にも制限はないが、高感度な検出を行うためには、フォトマルチメーターやアバランシェフォトダイオードなどが良く用いられる。波長選択素子 7 も励起光と蛍光を分離することが可能であれば制限はないが、ダイクロイックミラー

が良く用いられる。また、テレセントリック光学系は必ずしも完全に正確な構成でなくても、上述の特徴を得ることができるため、試料 11 の近傍 ($\pm 5 \mu\text{m}$ 程度) の範囲において平行光束が集光されないよう構成すればよい。この場合、平行光束の大きさ (幅) は、 $3 \mu\text{m} \sim 200 \mu\text{m}$ とすることが可能であるが、実際には $5 \mu\text{m} \sim 50 \mu\text{m}$ が適切な大きさである。

また本実施の形態では、試料 11 が担体 10 の上下どちら側に付いても、対物レンズ 3 に担体 10 の厚さを補正したものをを用いれば、測光は可能である。この対応は、高い隔壁などを持った担体 10 を用い、隔壁の形成されている側に試料が付いている場合などにも好適である。

(実施例)

以下、本発明の実施例を説明する。

本実施例では、図 1 に示した光学系を用い、微量蛍光読み取り装置を構成した。試料としては、市販のスライドガラス (マツナミガラス社製) 上に、プローブとして 19 塩基の一本鎖 DNA を、 100 nM と 10 nM の 2 種類の濃度で滴下した。滴下、乾燥後のプローブの大きさは、約 $350 \mu\text{m}$ であった。

このプローブの DNA に相補的な配列を含む 100 塩基の一本鎖 DNA の 3' 末端に、蛍光色素 (アマシャムファルマシアバイオテック社製 CY3) を標識した検体を、プローブを固定したスライドガラスと共に 60°C の温度で 1 時間反応させた。反応後、純水で洗浄、乾燥したスライドガラスを測定し

た。

図 4 は、本実施例の測定結果を示す写真である。本実施例では、プローブが固定されているスライドガラス S の中の幅 20 mm、長さ 60 mm の部分を測定している。図 4 に示すように、測定範囲全面に渡り、均一で明瞭な蛍光像が観察される。すなわち、本発明の特徴である、チップやマイクロアレイの歪みやたわみの影響を受けず、均一な蛍光観察が可能であり、測定走査が容易で感度が高い微量蛍光読み取り装置が実現されている。また、本発明の微量蛍光読み取り装置は、構成が簡単で、安価に構成できることも特徴である。

また、本実施例の比較例として、市販の共焦点検出器 (Packard BioChip Technologies 製品 Scan Array 4000 XL) により試料の測定を行った。試料は上記実施例と同じものを用いた。

図 5 は、比較例の測定結果を示す写真である。図 5 に示すように、平坦に見えるスライドガラス S であっても、広い測定範囲内での僅かなゆがみにより、測定できない部分 (右上部分等) が顕著に現われる。これでは正確な検査を行うことはできない。共焦点検出器においては、励起光が試料において合焦しており、合焦点前後での単位面積あたりの光量が大きく変化しているため、ゆがみなどにより試料が合焦位置からわずかでも変化すると、試料から発する蛍光強度が大きく変化してしまうからである。この図 5 の比較例と比べて、図 4 に示した本発明による微量蛍光読み取り装置の励起光は平行光束であり、対物レンズの焦点位置から試料がずれてしま

っても、単位面積あたりの光量の変化は無い。このことが、ゆがみやたわみに関わらず、均一な蛍光測光を可能としている。このように本発明による微量蛍光読み取り装置の効果は明白である。

なお、本発明は上記実施の形態のみに限定されず、要旨を変更しない範囲で適宜変形して実施できる。本発明による蛍光読み取りは、上記の試料だけを対象としたものではなく、測定対象を限定するものではない。

本発明によれば、以下のような作用を奏する。

(1) 本発明の蛍光読み取り装置によれば、励起光を平行光束とすることで、単位面積あたりの光量が一定となる。したがって、測定対象のDNAチップやDNAマイクロアレイの歪み、たわみ等の平面性に影響されずに均一な蛍光測光が行える。さらに、核酸の結合反応のような微弱な蛍光しか得られない試料からの微量蛍光を高感度に検出することができ、且つ、試料へ照射する励起光を一定の断面積を有した平行光束とすることで、試料の損傷も防げる光学系をなす。

また、簡易な光学系を採用することにより、小型で安価な装置を構成できる。さらに、対物レンズに対して試料が担体のどちら側に形成されていても測光が可能であり、操作が容易で測定条件が設定しやすい装置を構成できる。

(2) 本発明の蛍光読み取り装置によれば、テレセントリックな励起光学系により、試料に対する正確なピント調整が可能となる。

(3) 本発明の蛍光読み取り装置によれば、励起光が当た

ってる試料の面以外から発せられた蛍光や外乱光が光検出手段に到達することを防止できる。

(4) 本発明の蛍光読み取り装置によれば、試料の状態や測定目的に応じてピンホールの形状と径を変更できる。

(5) 本発明の蛍光読み取り装置によれば、試料からの蛍光を検出することで、蛍光量を測定することができる。

(6) 本発明の蛍光読み取り装置によれば、試料からの蛍光を検出することで、目的の核酸が存在するか否かを判定し、また存在した場合にはその蛍光量を測定することができる。

(7) 本発明の蛍光読み取り装置によれば、複数の試料に対する走査を高速化することができる。

産業上の利用可能性

本発明の蛍光読み取り装置によれば、励起光を平行光束とすることで、単位面積あたりの光量が一定となるため、測定対象のDNAチップやDNAマイクロアレイに歪みやたわみがあっても、均一な蛍光測光が実施できる。また、焦点深度が深いため、取得できる蛍光量が多く、バックグラウンドノイズの影響も受け難いことから、微量蛍光を高感度に検出することができ、SN比が向上する。

さらに、光学系が簡易であるため、装置を小型で安価に設計製作することが可能である。また、DNAチップやDNAマイクロアレイをステージ等に設置するだけで、厳密な合焦点を必要としないため、合焦操作や測定の条件設定が簡易である。また、担体の形状を選ばずに測定を行える。また、励起光に平行光を用いることから、試料の大きな面や単位面積

当たりに対する励起光の密度が少なくなるため、蛍光色素の劣化が少なくなる。

請 求 の 範 囲

1. 担体上もしくは溶液中に存在する試料からの蛍光を検出する蛍光読み取り装置であり、

平行光を照射する光源と、

この光源からの光を集光させる投光レンズと、

後側焦点位置に集光された前記光を、前記試料へ照射する対物レンズと、

前記試料から発し前記対物レンズを通った蛍光を結像する結像レンズと、

この結像レンズの結像位置に設けられた受光ピンホールと、

この受光ピンホールを通った前記蛍光を検出する検出手段と、

を具備したことを特徴とする蛍光読み取り装置。

2. 前記投光レンズの前側焦点位置に設けられ、前記光源から照射された平行光を整形する励起ピンホールを備えたことを特徴とする請求項1に記載の蛍光読み取り装置。

3. 前記結像レンズの結像位置に作られる像と前記受光ピンホールの大きさがほぼ等しいことを特徴とする請求項1または2に記載の蛍光読み取り装置。

4. 前記励起ピンホールの形状と前記受光ピンホールの径を変更可能としたことを特徴とする請求項2または3に記載の蛍光読み取り装置。

5. 前記試料は、核酸または核酸と結合した試薬に結合した蛍光色素からなることを特徴とする請求項1乃至4のいずれかに記載の蛍光読み取り装置。

6. 前記核酸の少なくとも一部が前記担体上に1つ以上固定化されており、前記核酸と特異的に結合する試薬に蛍光色素が結合していることを特徴とする請求項5に記載の蛍光読み取り装置。

7. 前記担体上に前記試料が一定間隔で配置されている標本が一定間隔毎に移動し、蛍光の測定と前記標本の移動とを繰り返して複数の前記試料を測定することを特徴とする請求項1乃至6のいずれかに記載の蛍光読み取り装置。

1/4

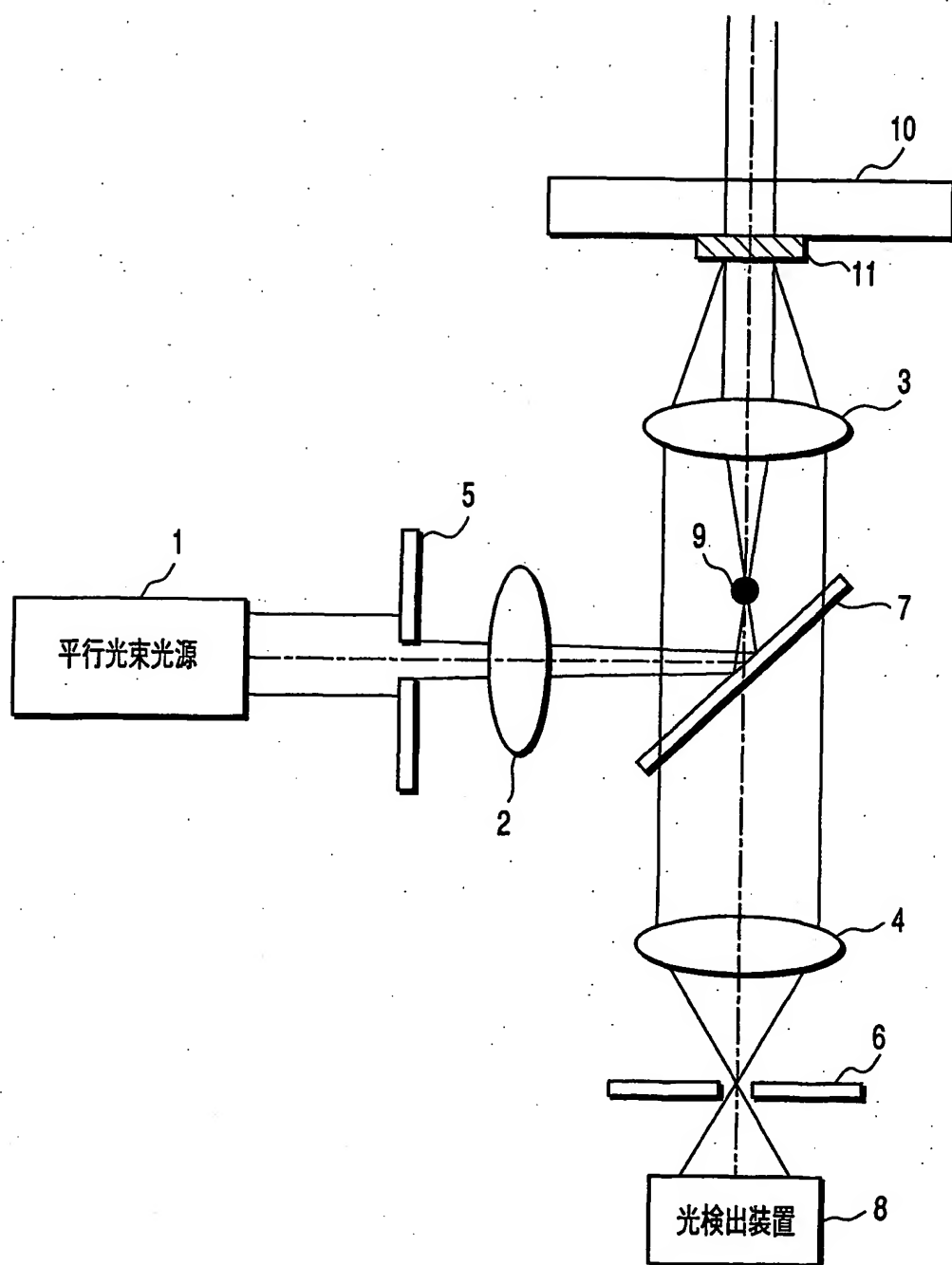


FIG. 1

2/4

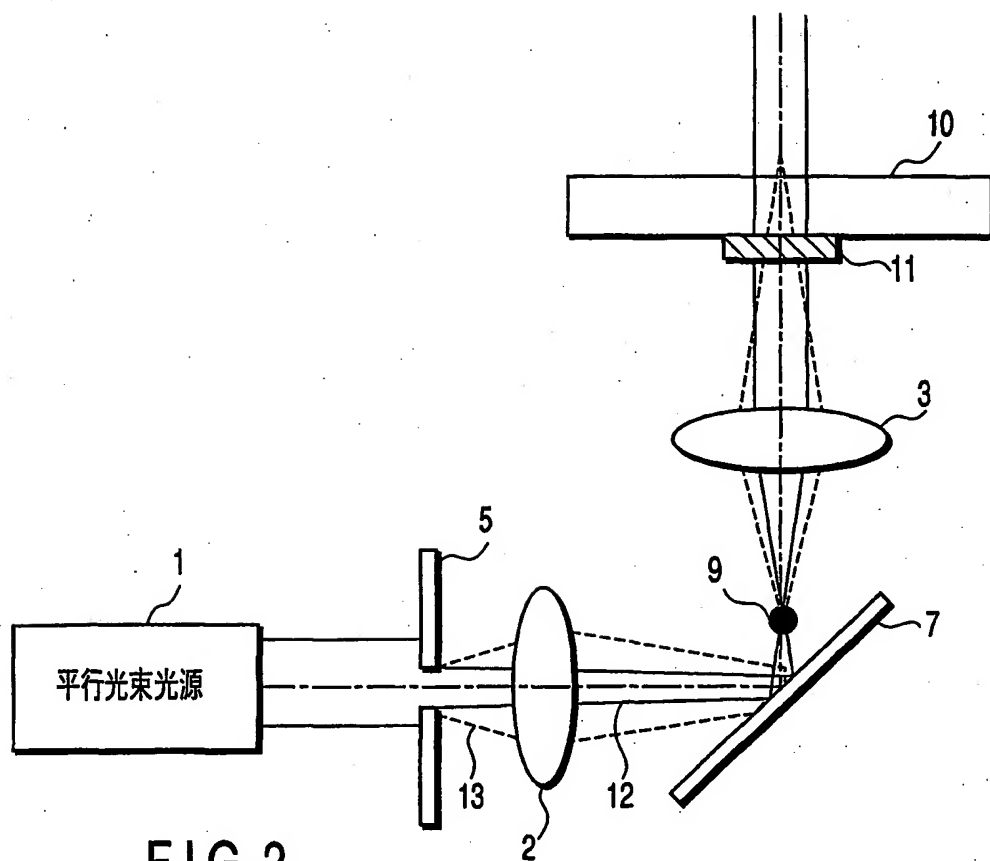


FIG. 2

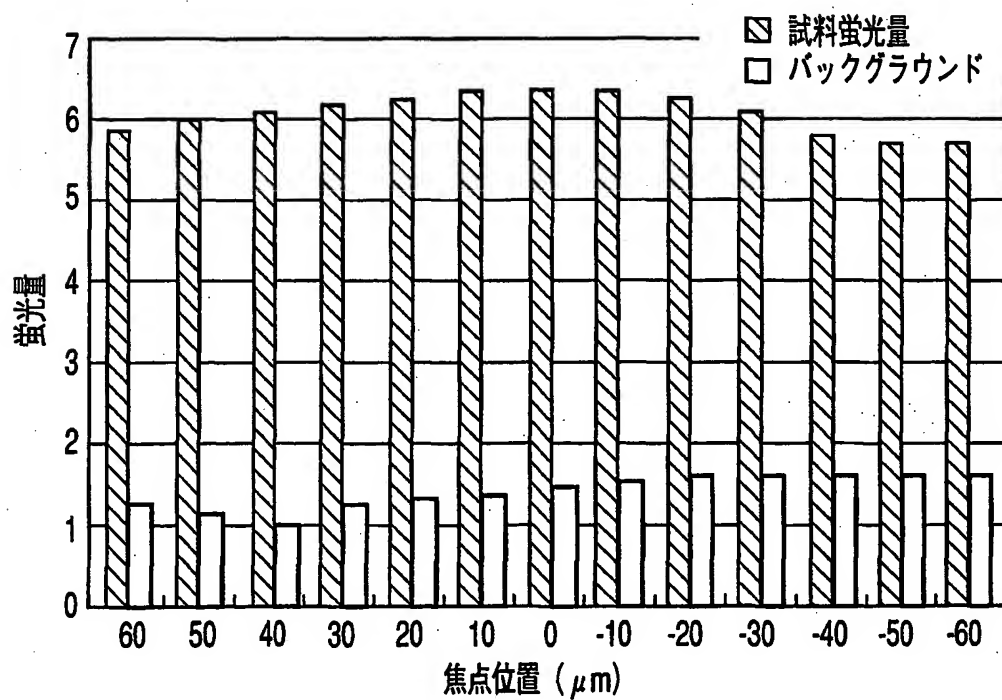


FIG. 3

3/4

51

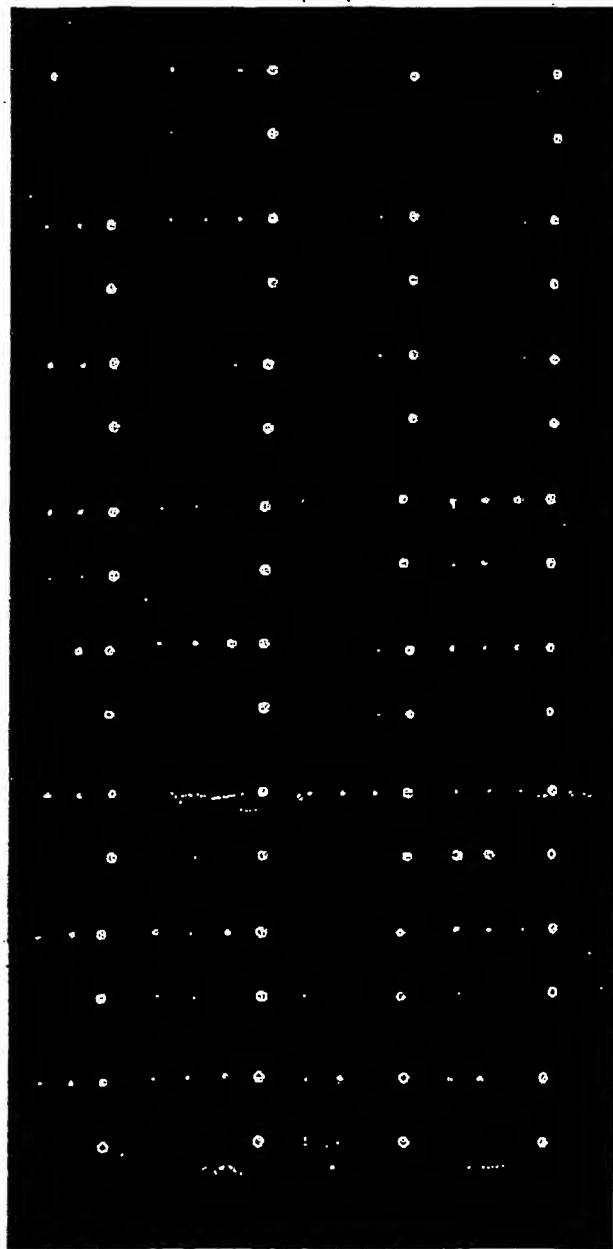


FIG. 4

51



FIG. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05280

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N21/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N21/62-21/74

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2002	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	JP 2002-14044 A (Nikon Corp.), 18 January, 2002 (18.01.02), Full text; Fig. 2 (Family: none)	1, 3
A	JP 8-43739 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 16 February, 1996 (16.02.96), Full text; Fig. 1 (Family: none)	1-7
A	JP 5-72481 A (Nikon Corp.), 26 March, 1993 (26.03.93), Full text; Fig. 1 & US 5296700 A	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 July, 2002 (02.07.02)Date of mailing of the international search report
16 July, 2002 (16.07.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N21/64

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N21/62-21/74

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2002年

日本国登録実用新案公報 1994-2002年

日本国実用新案登録公報 1996-2002年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	JP 2002-14044 A (株式会社ニコン) 2002.01.18 全文, 第2図 (ファミリーなし)	1, 3
A	JP 8-43739 A (オリンパス光学工業株式会社) 1996.02.16 全文, 第1図 (ファミリーなし)	1-7
A	JP 5-72481 A (株式会社ニコン) 1993.03.26 全文, 第1図 & US 5296700 A	1-7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.07.02

国際調査報告の発送日

16.07.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JJP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

横井 亜矢子

2W

9706

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)